Отклонений в поведении и состоянии животных первой и второй групп не отмечали, за исключением угнетенного состояния у одной свиньи из второй группы в течение 24 часов. В гематологической картине отмечали незначительные сдвиги у свиней второй группы в лейкоформуле. Однако эти изменения не выходили за рамки физиологической нормы (таблица 2).

Собаки. Под опыт взяли 10 собак весом 5,0-7,0 кг и разделили их на две группы: первой вводили внутримышечно Ципровет 5% для инъекций в дозе 5 мг/кг по ДВ (терапевтическая доза), второй – в дозе 25 мг/кг по ДВ (пятикратно увеличенная доза). Наблюдали за животными в течение 10 дней. При этом определяли гематологические и биохимические показатели крови.

Отклонений в физиологическом состоянии собак мы не отмечали. Животные хорошо поедали корм, были спокойны. В гематологических показателях также изменений не было (таблица 3).

Кошки. Под опыт взяли 12 кошек весом 2-2,5 кг и разделили их на две группы: первой вводили внутримышечно Ципровет 5% для инъекций в дозе 5 мг/кг по ДВ (терапевтическая доза), второй – в дозе 25 мг/кг по ДВ (пятикратноувеличенная доза). Наблюдали за животными в течение 10 дней. В гематологических и биохимических показателях изменений не наблюдали (таблица 4).

Заключение: Препарат Ципровет 5% инъекционный при внутримышечном или подкожном введении овцам, крупному рогатому скоту, поросятам, собакам и кошкам в терапевтической и пятикратноувеличенной дозах не вызывает изменений в физиологическом статусе животных.

SUMMARY
The drug Ciprovet 5% injectable for intramuscular or subcutaneous injection of sheep, cattle, pigs, dogs and cats in the therapeutic and pyatikratnouvelichennoy doses does not cause changes in physiological status of animals.

Контактная информации об авторах для переписки
Журавлев Д.А., к.в.н., ФГУ ВГНКИ, (г. Москва).

УДК: 619:616,993,1925:636,22/28:636,32/38

Н.А. Казаков, М.Ф. Идина
(ГНУ ВНИИЭВ им. Я.Р. Коваленко, ФГОУ СПО «Кашинский аграрный техникум»)

ПРИГОТОВЛЕНИЕ И ОКРАСКА МАЗКОВ КРОВИ ДЛЯ МИКРОСКОПИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ПРОТОЗОЙНЫХ И ДРУГИХ КРОВЕПАРАЗИТАРНЫХ БОЛЕЗНЕЙ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Ключевые слова: микроскопическая диагностика, протозойные болезни, кровепаразиты, крупный рогатый скот.

Умение хорошо приготовить мазок крови является основным требованием при гематологических исследованиях.

Научиться делать хорошие мазки можно только при выполнении всех рекомендаций, которые даются в руководствах по лабораторной практике, начиная от подготовки предметных стекол и кончая приготовлением самих мазков, их фиксацией и окраской.

Стекла для мазков должны быть абсолютно чистыми, хорошо обезжиренными, без следов кислот и щелочей. Для этого стекла сначала промывают в холодной воде, затем щеткой с мылом в теплой воде и, наконец, на 2-3 часа их помещают под струю водопровода. Приготовленные таким образом стекла протирают сухой мягкой стиранной (чистой) тряпкой и сохраняют в банке с притертой пробкой в смеси спирта и эфира (в равных частях).

Стекла, бывшие в употреблении, очищают от кедрового масла бензином или ксилолом, моют щеткой с мылом в теплой воде, кипятят в растворе гидрокарбоната натрия и несколько часов выдержива-

ют под водопроводной струей. Тщательно протирают чистой полотняной тканью и помещают в банку с притертой пробкой в смесь спирта и эфира (в равных частях). Перед употреблением стекла вынимают из смеси спирта и эфира пинцетом, не дотрагиваясь пальцами, вытирают чистой полотняной тканью и завертывают в чистую пергаментную бумагу.

Кровь для мазка берут из вен ушной раковины и лучше с внутренней поверхности; место укола выбривают, очищают спиртом и эфиром; укол производят иглой Франка или копьевидной иглой и, удалив ваткой первую выступившую каплю крови, берут для мазка вторую, прикасаясь к ней предметным стеклом, ближе к одному из его коротких краев. Предметное стекло рекомендуется держать за ребра, не касаясь поверхностей и зажимая его между большим и средним пальцами левой руки.

Мазки крови нужно делать возможно быстрее и увереннее, потому что только при таком условии они получаются ровными, однородными и не имеют прерывистых линий.

Прислонив шлифовальное стекло к капле крови на предметном стекле, дают возможность ей распределиться между двумя стеклами, что происходит почти моментально, если стекла чистые. Шлифовальное стекло по отношению к предметному должно находиться под углом не более 45-50^0 и фиксироваться так, чтобы кончики пальцев, удерживающие это стекло, касались края предметного стекла. При такой фиксации мазок получается с очень ровными краями. Шлифовальное стекло передвигают таким образом, чтобы капля непрерывно тянулась за его краем, располагаясь тонким слоем по предметному стеклу. Необходимо научиться брать каплю такой величины, при которой мазок кончается прежде, чем шлифовальное стекло будет доведено до конца предметного стекла.

Для каждого мазка берут свежую каплю крови, а кожу уха перед взятием каждой капли крови вытирают ватой досуха.

Описанный метод приготовления мазков крови из вен уха применим к ситуации, когда количество животных небольшое и есть возможность (с учетом стерильности) готовить мазки в местах их содержания.

В случае же большого поголовья животных, подлежащего исследованию по микроскопической диагностике, пользуются другим методом взятия крови. Кровь для последующего приготовления мазков в лабораторных условиях в день ее получения берут (1-2 мл) из яремной вены (V. jugularis) в стерильные пробирки Флоринского, герметично закрытые резиновыми пробками, с добавлением 3-5 МЕ гепарина (жидкого или в порошке) на 1 мл крови. Обработка места взятия крови проводится аналогично сказанному выше (из вен уха). Кровь берут иглой малого диаметра, струя должна быть направлена на стенку пробирки. Пробирку после взятия крови плотно закрывают резиновой пробкой. Кровь в пробирке размешивают вращательными движениями внутри поверхностей обеих рук, не допуская при этом попадания крови на пробку.

Кровь из пробирки Флоринского, после полного растворения гепарина, в необходимом количестве берут стерильной пастеровской пипеткой и помещают на предметное стекло. Далее с предметного стекла шлифовальным стеклом берут необходимое количество крови и готовят мазок аналогичным способом, описаном выше, т.е. когда кровь брали непосредственно из вен уха.

Идеально приготовленный мазок крови должен удовлетворять следующим требованиям: быть очень тонким и при осмотре на свет отливать цветами радуги; быть совершенно ровным по густоте, не иметь пустот и разрывов; занимать не менее $^2/_3$ длины предметного стекла и, не доходя до его конца, завершаться в виде бахромки или сходить на нет; иметь ширину более узкую, чем ширина предметного стекла.

Приготовленные мазки крови высушивают на воздухе в течение 3-5 минут, а в холодное время – в термостате, в струе теплого воздуха отражательной лампы, около радиатора, истопленной печи и т.д.; на высушенном мазке проставляют дату его изготовления, номер и кличку животного. Мазки, сделанные при низкой окружающей температуре (в зимнее время), в теплой комнате могут отпотеть, а эритроциты гемолизироваться. В таких случаях их следует слегка подсушить на воздухе, а потом тотчас же опустить в банку с фиксирующей жидкостью (метанолом; этанолом и эфиром). В летнее время, когда имеется опасность поедания мазка крови мухами, его следует сохранять в закрытой чашке Петри или в какой-либо другой посуде.

Мазки крови нужно приготавливать утром, до кормления животного, и пользоваться при этом одной и той же методикой.

Фиксация мазков, имеет целью сохранить клетки крови, чтобы их форма и

внутренняя структура остались почти неизменными. Лучшим фиксатором мазков является химически чистый, абсолютный метиловый спирт нейтральной реакции, в котором мазок фиксируется в течение 3-5 минут. Для экономии спирт можно наливать непосредственно на горизонтально лежащий мазок, возможно, более толстым слоем. Также можно опускать препарат в спирт, налитый в стеклянную или фарфоровую кюветку, покрыв ее плотно крышкой, чтобы спирт не испарялся. Если спирт после фиксации не загрязняется, то его можно использовать для фиксации и повторно. В других фиксаторах, применяемых в лабораторной практике, мазки рекомендуется выдерживать следующее время: в абсолютном этиловом спирте – 10-20 минут; в ацетоне – 5 минут; в равных частях спирта и эфира (в закрытой посуде) – 10-20 минут; в смеси равных частей ацетона и метилового спирта – 5 минут; в чистом метиловом спирте – 3-5 минут.

Нейтрализация дистиллированной воды. Для получения правильной окраски мазков весьма важно, чтобы дистиллированная вода, которой пользуются в процессе обработки препарата, имела нейтральную реакцию. Краска, разведенная водой кислой реакции, слабо окрашивает препарат, особенно ядра, создавая общий красноватый тон. Наоборот, краска, разведенная водой щелочной реакции, чрезмерно окрашивает мазок, придавая общий синеватый тон и окрашивая в этот цвет эритроциты. Правильно окрашенный препарат при просмотре его невооруженным глазом представляется розово-фиолетовым, а эритроциты в таком мазке имеют под микроскопом розовый цвет.

Для определения реакции воды пользуются гематоксилином. С этой целью в химический стаканчик опускают на кончике ножа гематоксилин и наливают несколько миллилитров испытываемой дистиллированной воды. В другой такой же стаканчик для контроля наливают дистиллированной воды, но известной реакции. Оба стаканчика помещают на лист белой бумаги и просматривают при дневном освещении. Если испытуемая вода имеет нейтральную реакцию, то в промежутке времени от одной минуты до пяти она окрашивается в розово-фиолетовый цвет. Если вода кислая, то окрашивание наступает только минут через 15-20. если вода оказывается щелочной, то она окрашивается в резко фиолетовый цвет в течение полминуты, максимум одной минуты. Кислую дистиллированную воду усредняют 1% раствором карбоната натрия, а щелочную – 1% раствором уксусной кислоты.

К 100 мл дистиллированной воды кислой реакции добавляют несколько капель раствора карбоната натрия и опять проверяют гематоксилином. Определив, сколько капель раствора карбоната пошло на нейтрализацию 100 мл воды, подсчитывают, сколько капель этого раствора необходимо для усреднения 1 л воды. По этому же принципу усредняют щелочную воду.

Объективным методом определения реакции воды принято также считать пробу с нейтральрот. Предварительно готовят на дистиллированной воде 1% раствор нейтральрот. Затем отмеривают 200 мл испытываемой дистиллированной воды и в нее вносят одну каплю раствора нейтральрот. Вода слегка кислой реакции окрашивается в красный цвет. Окрашенную воду разливают поровну в два одинаковых химических стаканчика, и в один из них добавляют по каплям 1% раствор карбоната натрия. После каждой капли воду встряхивают и получающийся оттенок сравнивают с цветом жидкости в контрольном стаканчике. Концом нейтрализации воды считается тот момент, когда цвет ее изменится в оранжевый, не переходящий в контрольный в течение 20-30 секунд. Зная количество капель карбоната натрия, пошедших на нейтрализацию 100 мл, можно подсчитать, сколько необходимо капель для усреднения любого количества воды.

Окраска мазков. Окрашивание мазков крови требует внимательного отношения и определенного опыта. Нередко прекрасно приготовленный и хорошо зафиксированный мазок легко может быть испорчен при окрашивании, если строго не придерживаться рекомендуемых правил окраски. Способов окраски крови существует очень много, но наиболее распространенными из них являются: окраска по Романовскому-Гимза, по Лейшману, по Паппенгейму и по Романовскому-Нохту.

Протозоологи мира на протяжении многих десятилетий отдают предпочтение окраске мазков крови по методу Романовского-Гимза, позволяющему успешно выявлять возбудителей протозойных и других кровопаразитарных болезней животных. Не секрет, что своевременно и правильно поставленный диагноз – залог успешного проведения оздоровительных мер борьбы с возбудителями указанных заболеваний.

Окраска по Романовскому-Гимзе. При окраске по этому способу пользуются уже

готовой краской Гимзе, в которую входят: азур П – 3,0, эозин В – 0,8, химически чистый глицерин и химически чистый нейтральный метиленовый спирт по 250,0; перед употреблением краску разводят из расчета 1-4 капли краски (с учетом титра) на 1 мл дистиллированной воды.

Предварительно фиксированный препарат кладут мазком вниз на спички или тонкие стеклянные палочки в чашку Петри и подводят под него краску.

В зависимости от внешней температуры, а также от свежести мазка (желательны свежие мазки) окрашивание продолжается 30-45 минут. Чем ниже температура воздуха, тем больше следует держать мазок в краске. Например, на окраску свежих мазков в сухую жаркую погоду требуется меньше времени, чем для старых мазков или в сырую холодную погоду.

Окрашенный препарат обмывают струей усредненной дистиллированной воды и высушивают на воздухе. Для того, чтобы получить правильно окрашенный мазок (розово-фиолетового оттенка), необходимо соблюдать следующие правила:

1. Раствор краски готовят ex tempore, добавляя ее к воде каплями, а не наливая сразу;
2. Не допускать концентрации краски больше 3-4 капель на 1 мл дистиллированной воды;
3. Использовать для разведения одну и ту же всегда чистую посуду (мензурку, цилиндр);
4. При приготовлении краски не размешивать ее металлическими предметами и очень энергичными встряхиваниями;
5. Разводить краски дистиллированной водой, имеющей РН 7,0-7,2.

Для получения красивой дифференцированной окраски рекомендуется (А.В. Васильев) оставлять на мазке дистиллированную воду в течение одной минуты.

Также не следует забывать, что краска Гимза, постоявшая на холоде или в сыром месте, сильно портится. Для восстановления ее качества краску помещают в водяную баню с температурой 60^0 на 15 минут.

После этого краска снова хорошо окрашивает и даже в меньшей концентрации, чем раньше, В лаборатории протозоологии ВИЭВ на протяжении десятилетий, кроме описанного, используют модифицированный метод, позволяющий одновременно окрашивать большое (в сравнении с методом окрашивания мазков крови в чашках Петри) количество мазков крови, необходимое, например, при выездах в неблагополучные хозяйства с большим поголовьем скота.

Для этой цели берут металлические поддоны, в них помещают стерильные «оконные» стекла (50 x 50 см); вырезают стеклянные полосы шириной не менее 3 см и длинной – 40-45 см и располагают друг от друга на 3-5 мм с тем, чтобы при подслоении краски не образовывались пузырьки воздуха. Далее окрашивание мазков крови проходит аналогично методу с применением чашек Петри.

Критериями оценки правильной окраски мазков крови служит четкое, с сохранением структуры, окрашивание клеток белой крови (лимфоциты, нейтрофилы, эозинофилы и др.)

Если клетки белой крови не окрашены или плохо окрашены, то мазки крови не пригодны для микроскопических исследований, так как не будут окрашены и возбудители протозойных болезней, анаплазмоза крупного рогатого скота.

Anaplasma marginale содержит ДНК и РНК (J.E. Moulton, J.F. Christensen, 1955)/

Лейкоциты могут служить в качестве критерия правильности окрашивания, так как содержат обе нуклеиновые кислоты.

Важны и методы учета паразитов:

1. При анаплазмозмоносительстве или в начальный период заболевания, учитывают количество возбудителей в 100 полях зрения микроскопа;
2. В клинический период заболевания (при высокой пораженности эритроцитов возбудителями) например, после спленэктомии (удаление селезенки) достаточно подсчитать паразитов в 1000 эритроцитов и выражать полученное количество в процентах (50-60% и более).

Это принятое в протозоологии требование весьма важно и необходимо, так как, например, при высокой пораженности эритроцитов возбудителями ученые-протозоологи часто тотально обескровливают больных животных для последующего приготовления, к примеру, анаплазменного антигена для серологических исследований или конструирования вакцины для последующей иммунизации животных в неблагополучных или угрожаемых (по анаплазмозу) животноводческих хозяйствах.

Чтобы не впасть в диагностические ошибки, важно устанавливать различия между морфологически сходными с анаплазмами – тельцами Говель-Жоли и про-

стыми артефактами (загрязнением мазков крови):

а) анаплазмы в 80-90% случаев расположены по периферии эритроцитов с легкой зоной просветления вокруг них;

б) тельца Говель-Жоли (особенно редкие) чаще расположены эксцентрично в эритроците, грубее окрашиваются и крупнее по размерам. Эти включения, как сообщает A.M. Penha (1930), имеют ДНК, но, возможно, и РНК, о чем недостаточно информации.

в) отличия анаплазм от артефактов устраняются при микроскопии внимательным вращением микровинта: если эритроциты и находящиеся в них точечные образования при вращении микровинта появляются и исчезают одновременно – это анаплазмы; если же они появляются и исчезают с некоторым свечением разновременно – это артефакты, лежащие в различных плоскостях от эритроцитов.

Эти различия необходимо учитывать при постановке диагноза на анаплазмоз, особенно при малой пораженности эритроцитов анаплазмами и значительной засоренности мазка артефактами, часто ведущими к диагностическим ошибкам.

РЕЗЮМЕ
Правильно приготовленный мазок крови и своевременно поставленный диагноз – залог успешного проведения оздоровительных мер борьбы с возбудителями указанных заболеваний.

SUMMARY
Properly prepared blood smear and a timely diagnosis – the key to successful conduct of health measures to combat the pathogens of these diseases.

Литература

1. И.В. Абрамов и др. Анаплазмозы животных. М., 1965, с. 239;
2. В.Т. Заблоцкий Современное состояние и перспективы исследований по разработке мер борьбы и профилактики протозойных болезней животных. Вестник ветеринарии, № 24, 2002, с. 11-15
3. П.С. Ионов, В.Г. Мухин, Н.Р. Семушкин, А.И. Федотов, И.Г. Шарабрин Лабораторные исследования в ветеринарной клинической диагностике. Второе переработанное издание. Под редакцией доктора ветеринарных наук, профессора П.С. Ионова. Государственное издательство с/х литературы. М – 1957, с. 156-164
4. Дьяконов Л.П., Гробов О.Ф. Новое в изучении анаплазм крупного рогатого скота (обзор). Сельское хозяйство за рубежом № 3, 1964

Контактная информации об авторах для переписки
Николай А. Казаков, ведущий научный сотрудник, кандидат ветеринарных наук, ГНУ ВНИИЭВ им. Я.Р. Коваленко;тел:

УДК: 619:618.7:636.22-084

Т.И. Кугелева
(ФГУ «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов»)

ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ ПРЕПАРАТА АЙСИДИВИТ В КОМПЛЕКСНОЙ СХЕМЕ ПРОФИЛАКТИКИ ПОСЛЕРОДОВЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ У КОРОВ

Ключевые слова: айсидивит, послеродовые осложнения, задержание последа,коровы, профилактика.

В животноводческих предприятиях Центрального района Российской Федерации, основным направлением которых является производство молока, эксплуатируют преимущественно скот голштинизированной черно-пестрой породы. Наиболее часто причиной снижения продуктивности коров является возникновение послеродовых осложнений на фоне снижения неспецифической резистентности организма. Для стимуляции естественной резистентности организма в медицине широко используются биогенные препараты, изготовленные из тканей растительного и животного происхождения по методу академика В.П.Филатова. Подобные препараты представляют собой комплекс низкомолекулярных пептидов и обладают широким биологическим действием, повышают защитные силы организма. В настоящее время многие специалисты склоняются к использованию биологических стимуляторов и в ветеринарии.

Одним из таких препаратов являет-